

8. Менделевич В.Д. Аддиктивное влечение: теоретико-феноменологическая оценка // Теория и практика психотерапии, 2015, № 2 (6), стр. 27-33.

9. Узлов Н.Д. Жизнь как аддиктивный проект: попытка интроспективного анализа. С. 38-45 // Н. Д. Узлов Личность, болезнь, криминальность: избранные статьи по клинической и пенитенциарной психологии. Пенза: Научно-издательский центр «Социосфера», 2014. – 220 с.

10. Узлов Н.Д. Homo addictus positivus: иллюзия или потенциальная возможность? // Психопатология и Аддиктивная Медицина. – 2016. – Т.2. – № 1 (март 2016). – С. 42-48.

11. Франкл В. Человек в поисках смысла. М.: Прогресс, 1990 – 368 с.

12. Франкл В. Воля к смыслу. Основы и применение логотерапии. М.; "Институт Общегуманитарных Исследований, 2015 - 144 с.

13. Франкл В. Доктор и душа: Логотерапия и экзистенциальный анализ. М.: ООО «Альпина нон-фикшн», 2017 – 179 с.

14. Шевелева М.В., Шабанов П.Д. и др. Нейробиологические механизмы систем награды и наказания в головном мозге при активации прилежащего ядра. / Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии, том 11/2013/3, с. 3-19.

15. Glasser William, Positive Addiction («Положительная склонность» или «Положительная зависимость»), 1976.

16. Griffiths M.D. Is “loss of control” always a consequence of addiction? *Front. Psychiatry* 4:36. 2013. URL: <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00036> (дата обращения 5.03.2019)

17. Rachlin, H. The Science of Self-Control. Cambridge: Harvard University Press. 2000.

Natrus L.V.

Doctor of medicine, professor

Bogomolets National Medical University

Research Science Institute of Experimental and Clinical Medicine

Ryzhko I.M.

Head of the Laboratory for Clinical Laboratory Diagnostics

Bogomolets National Medical University

Research Science Institute of Experimental and Clinical Medicine

Konovalov S.E.

Candidate of Medical Sciences Assistant of the Department of otorhinolaryngology

Bogomolets National Medical University

Ryzhko D.A.

intern doctor

Kiev City Clinical Hospital №3

THE INFLUENCE OF HYPERGLYCEMIA ON NF-KB-DEPENDENT ANGIOGENESIS OF THE CONNECTIVE TISSUE OF THE SKIN DURING REPARATION OF BURN INJURY

Натрус Л.В.

Доктор медичних наук, професор

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Науково-дослідний інститут експериментальної і клінічної медицини

Рижко І.М.

Завідувач лабораторією клінічної лабораторної діагностики

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Науково-дослідний інститут експериментальної і клінічної медицини

Коновалов С.Є.

Кандидат медичних наук, асистент кафедри оториноларингології

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Рижко Д.А.

лікар-інтерн

Київська міська клінічна лікарня №3

ВПЛИВ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ НА NF-KB-ЗАЛЕЖНИЙ АНГІОГЕНЕЗ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ ШКІРИ БЛИХ ЩУРІВ ПРИ ЗАГОЄННІ ОПІКОВОЇ ТРАВМИ

Summary. It was revealed that in conditions of experimental diabetes, the direction of evolutionarily “deep” regulatory mechanisms in the form of expression of the transcription factor pNF-κB in the regenerate and its effect on the proliferative activity of BM remains, but the degree of this response is less than normal. The greatest changes were found in the peripheral response link. In the connective tissue there is a change in the sequence of wound healing reactions, disruption of intercellular cooperation and a decrease in the effectiveness of the paracrine effect between cells in the form of regulatory signals to stimulate angiogenesis.

This prevents the physiological course of burn wound healing, leads to abnormal vascular changes, delays and disrupts the restoration of connective tissue architectonics, and may be an important factor in impaired tissue regeneration in diabetes.

Резюме. Виявлено, що, за умов експериментального ЦД зберігається направленість еволюційно «глибоких» регуляторних механізмів у вигляді експресії транскрипційного фактору pNF-κB в регенерації та його впливу на проліферативну активність КМ, але ступень цієї відповіді є меншою ніж в нормі. Найбільші зміни виявлені в периферичній ланці відповіді. В сполучній тканині відбувається зміна послідовності реакцій загоєння рани, порушення міжклітинної кооперації та зменшення ефективності паракринного впливу між клітинами у вигляді регуляторних сигналів для стимуляції ангиогенезу. Це запобігає фізіологічному перебігу загоєння опікової рани, призводить до патологічних змін судин, відтермінує та порушує відновлення архітектоники сполучної тканини, і може бути важливим чинником погіршення регенерації тканин при ЦД.

Key words: angiogenesis, hyperglycemia, burn injury

Ключові слова: ангиогенез, гіперглікемія, опікова травма

Актуальність. Добре відомо, що серцево-судинні ускладнення - основна причина смерті хворих на цукровий діабет (ЦД). Саме стінка судини є основною мішенню для пошкодження при ЦД. Основним фактором, що ушкоджує є гіперглікемія, яка через активацію сорбітолового шляху, протеїнази С і глікірування білків призводить до розвитку оксидативного стресу, зменшення утворення оксиду азоту, активації прозапального шляху NF-κB. Збільшення синтезу білків позаклітинного матриксу клітинами судинної стінки, з одного боку, сприяє прискореному розвитку атеросклерозу і прогресуванню макроангіопатій, а з іншого - викликає ушкодження мікросудинних русла. Окрім цього, процеси репарації судини і неоваскуляризації здійснюються за участю циркулюючих ендотеліальних попередників, які рекрутуються з кісткового мозку у відповідь на ішемію і пошкодження судин. Враховуючи складну різнорівневу систему взаємодії клітин та регуляторних цитокінів, вивчення ангиогенезу залишається актуальним, особливо за умов гіперглікемії.

Реакція тканини після пошкодження - динамічний процес, що складається з послідовних етапів (запалення, проліферації та ремоделювання), спрямований на відновлення архітектури та функції тканин. Ангіогенез, як важлива складова репарації, є процесом що регулюється як системними гуморальними сигналами з плазми крові, так і локальними - з екстрацелюлярного матриксу. Основним кроком ангиогенезу є відростання нових судин від вже існуючих. При виникненні локальної ішемії ендотеліальні клітини (ЕК) активуються за рахунок того, що за умов гіпоксії в клітинах тканин підвищується експресія і секреція ангиогенних чинників, перш за все фактор росту ендотелію судин - VEGF, рецептори до якого селективно експресовані на ЕК. Взаємодія VEGF з рецепторами активує експресію протеаз в ЕК, вони руйнують міжклітинні контакти і базальну мембрану, починають активно ділитися і мігрувати в ішемізовану тканину по градієнту хемоаттрактанта з утворенням нового судинного відростка [1,2].

В наших попередні дослідженнях були вивчені патоморфологічні, гістохімічні та електронномікроскопічні особливості перебігу регенераторного процесу за гіперглікемії і показано що гіперглікемія зумовлює відтермінування у часі регенераторних процесів у дермі і епідермісі шкіри. Були виявлені ознаки затримки ангиогенезу і порушення трофіки підлеглих тканин дерми за рахунок суттєвої перебудови структурної організації клітин регенерату, особливо макрофігів та фібробластів, що негативно відзначається на комунікативних зв'язках фібробластів з іншими клітинами [3,4].

Шляхом аналізу мієлограми ми виявили, що гіперглікемія впливає на потужність проліферації і активність диференцировки в кістковому мозку (КМ), викликає перерозподіл клітинних елементів гемопоетичного походження, що відображається на кількості та функціональній спроможності клітин, які приймають участь в регуляційному сигналіну при регенерації сполучної тканини. Зміна відносного вмісту клітинних попередників в КМ та несвоєчасний вихід клітин з КМ в периферичну кров зумовлює порушення сценарію регенерації сполучної тканини та стає причиною трофічних виразок або незагоєння рани при ЦД [5]. VEGF, ангиопоетин, фактор росту фібробластів (FGF) і трансформуючий ростовий фактор бета (TGFβ) найпотужніші ангиогенні цитокіни. Експресія VEGF, який є ключовим регулятором формування кровоносних судин і має прямий хемотаксичний ефект на ендотеліальні клітини знаходиться під контролем NF-κB.

Транскрипційний фактор NF-κB вважається тригером запалення, при активації якого прозапальними цитокінами (IL-1, TNFα, тощо) індукується експресія інших прозапальних генів, включаючи цитокіни, хемокіни та молекули адгезії. У нормі NF-κB присутній в цитоплазмі в неактивній формі завдяки комплексу з гальмівною субодиноцею IκB, що перешкоджає проникненню NF-κB в ядро. Ключову роль в NF-κB - сигналіну грає регуляція взаємодії NF-κB з IκB. Позаклітинні сигнали сприймаються мембранними рецепторами, передаються всередину клітини, що запускає сигнальний каскад активації, відокремлення та наступної убіквітинізації IκB-кінази (IKK), і є умовою активації NF-κB [6].

Є дослідження щодо вмісту VEGF в ушкодженій тканині, які показали, що як людські, так і тваринні нейтрофіли є джерелом VEGF [7]. Нейтрофіли, які інфільтрувалися у тканину, не тільки продукують VEGF, але здатні взаємодіяти з епітеліальними клітинами, індукуючи вироблення VEGF в них. Макрофаги, моноцити також можуть стимулювати ангиогенез шляхом доставки проангіогенних факторів росту (наприклад, VEGF-A та VEGF-C), а також шляхом вивільнення протеїназ, які деградують компоненти екстрацелюлярного матриксу, сприяючи вивільненню факторів росту з регенерату і проростанню судин [8]. Але механізми, що лежать в основі стимуляції притоку клітин-джерел VEGF до зони гіпоксії, залишаються невизначеними. Вивчення основних механізмів функціонування проангіогенних лейкоцитів на ділянках гіпоксії, в тому числі із залученням VEGF-A, має важливе значення для терапевтичної регуляції місцевого ангиогенезу.

Мета: вивчити вплив гіперглікемії на вміст NF-κB-залежних протеїнів ангиогенезу у сполучній тканині шкіри і клітин периферичної крові білих щурів в динаміці загоєння опікової травми, для розуміння особливостей пошкодження тканинної репарації при ЦД.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження динаміки (3,7,14,21 доба) гоєння опікової рани шкіри проводили на статевозрілих щурах-самцях лінії Wistar масою 180-210 г без соматичної патології – «група контролю» (n=24) та щурів (n=24) із експериментальним ЦД, який викликали введенням тваринам стрептозоцину внутрішньоочередно одноразово в дозі 50 мг/кг. Ознакою розвитку захворювання було встановлення стійкої гіперглікемії через 1 місяць після введення препарату на рівні (середнє±стандартна похибка) – $12,56 \pm 1,44$ ммоль/л проти $5,31 \pm 0,27$ ммоль/л в контрольній групі.

Для експериментального моделювання опіку напередодні, в умовах вільної поведінки щурам оголювали прямокутну ділянку шкіри тулуба шляхом нанесення крему для депіляції з експозицією 4-5 хвилин. Шкіру після процедури обробляли фізіологічним розчином і антисептиком, але вона була не пошкодженою, рівномірно гладенькою, без волосяного покриву. Наступного дня, на щурах під ефірним наркозом моделювали опік. Використовували дві мідні пластини у вигляді еліпсу. Кожна мала розміри 3,7x4,5 см і площу 0,0052 м². Пластини витримували в окропу (100° C) 10 хвилин і накладали одночасно симетрично на обидві оголені частини тіла щурів з експозицією 10 секунд. Загальна площа опіку шкіри складала 18-20 % поверхні тіла, що є цілком достатнім для формування опіку II ступеня – дермального поверхневого опіку (за старою класифікацією – це III A ступінь).

У вказаний термін (3, 7, 14, 21 добу) щурам вводили однократно внутрішньоочередно

велику дозу тіопенталу натрію і виводили із експерименту шляхом декапітації. Усі маніпуляції з піддослідними тваринами проводили з дотриманням загальноприйнятих біоетичних норм гуманного поводження з лабораторними тваринами у відповідності до міжнародних та національних положень стосовно проведення експериментів із залученням тварин: «Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей»; «Загальні етичні принципи проведення експериментів на тваринах», Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV, засідання Комісії з Біоетики НМУ, протокол №94 від 16.03.2016.

В тканині регенерату методом Вестерн-блот аналізу визначали вміст фосфорильованої за Ser 311 субодиниці p65 ядерного фактору каппа В (NF-κB), IκB-α, фактору росту судинних ендотеліальних клітин (VEGF) та рецептору VEGF (Flt-1). Для приготування зразків фрагменти шкіри (200-250 мг) подрібнювали у порцеляновому тиглі і розтирали за присутності рідкого азоту до гомогенного стану. Наважки тканин шкіри (100 мг) змішували з буфером екстракції протеїнів RIPA (20 mM трис-НCl, pH 7,5; 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% дезоксихолату натрію 20 mM Tris-НCl, pH 7,6, 1% Triton-X100, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 0,2% DCH) у співвідношенні 1:10 (вага/об'єм) та коктейлем інгібіторів протеїназ і фосфатаз (PIC), інкубували на льоду протягом 20 хв та піддавали ультразвуковій дезінтеграції за допомогою приладу Sartorius (Labsonic® M, ФРН). Отримані гомогенати центрифугували при 16 тис. g протягом 20 хв. за 4 °C. Після центрифугування надосадову рідину збирали та переносили до пластикових пробірок Eppendorf. Концентрацію загального протеїну вимірювали спектрофотометрично за методом Stoscheck [1,2] з модифікаціями, використовуючи спектрофотометр CF-2000 (ОКБ «Спектр», РФ). Протеїнові екстракти змішували з буфером Леммлі (150 mM трис-НCl (pH 6.8), 1% SDS, 0.3% бромфеноловий синій, 20% гліцерил) та проварювали при 95 °C протягом 5 хв для подальшого зберігання.

Електрофоретичне розділення протеїнів зразків шляхом електрофорезу у поліакриламідному гелі (SDS-PAGE електрофорез) проводили у вертикальній камері BioRad (США), використовуючи електродний буфер (25 mM трис-НCl (pH 8,3), 0.192 M гліцину, 0.1% SDS). Кількість загального протеїну, що вносили до лунков гелю, становила 50 мкг. Концентрування зразків проводили при напрузі, що не перевищувала 50 В, розділення – 160 В. Для ідентифікації молекулярних мас протеїнів використовували суміш забарвлених протеїнових маркерів (PageRuler, кат. № 26616, Fermentas, Литва).

Перенесення протеїнів з гелю до нітроцелюлозних мембран (діаметр пор 0.45 мкм, GE Healthcare, Amersham, Велика Британія)

проводили у трансфер-буфері (12.5 мМ трис-НСІ буфер (рН 8.3), 0.198 М гліцин та 20 % метанол) протягом 60 хв. при напрузі 30 В і постійному охолодженні. Після завершення трансферу протеїнів мембрани відмивали від залишків буферу у 50 мМ фосфатному фізіологічному буфері, що містив 0.05 % Triton X-100 (PBST) (рН 7.4). Блокування місць неспецифічної сорбції антитіл проводили у 5%-му розчині знежиреного сухого молока (Carnation, США) у PBST протягом 120 хв. при кімнатній температурі. Після блокування мембрани інкубували зі специфічними антитілами проти VEGF (Merck, ФРН, кат. № 05-1117, 1:2000 у PBST), фосфорильованої за Ser 311 субодиниці р65 NF-кВ (Santa Cruz, США, 1:200 у PBST), ІкВ- α (Santa Cruz, США, 1:500 у PBST) та Flt-1 (Santa Cruz, США, 1:500 у PBST), протягом 16 год. при 4 °С. Далі мембрани промивали на горизонтальному шейкері у 6 змінах PBST по 5 хв. кожна, після чого інкубували 90 хв. при кімнатній температурі з відповідними *вторинними антитілами*, кон'югованими з пероксидазою хрому (anti-mouse IgG 1:5000, Abcam, США, кат. № ab197767 або anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate 1:2500, Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Неспецифічно сорбовані вторинні антитіла відмивали у шості змінах того ж буферу. Детекцію комплексів антиген-антитіло проводили за допомогою методу підсиленої хемілюмінесценції (ECL), використовуючи 0.25 М розчин люмінолу у ДМСО, 0.09 М розчин кумарової кислоти у ДМСО, 0.1 М трис (рН 8.5) та 0.0035 % H₂O₂. Візуалізацію специфічного забарвлення здійснювали на рентгенівських плівках Konica Minolta (Medical & Graphic, Inc, Японія). Отримані плівки сканували для проведення кількісного денситометричного аналізу з використанням програми TL-120 (TotalLab Ltd., США). Відносний вміст Flt-1, VEGF, фосфоNF-кВ р65 та ІкВ- α виражали в умовних одиницях оптичної густини (arbitrary units). За одиницю приймали вміст

протеїнів в перший термін спостереження – 3 доба.

Підрахунок формених елементів периферичної крові шляхом візуальної оцінки мазку крові та за допомогою гематологічного аналізатора MicroCC.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою статистичного пакету IBM SPSS Statistics 23. Розраховували коефіцієнт кореляції Пірсона (R), з р-значенням, 95% довірчий інтервал для коефіцієнта кореляції. Для перевірки розподілу на нормальність використано критерій Шапіро-Уїлка. Для порівняння показників на всіх термінах спостереження було використано критерій множинного порівняння – критерій Шеффе.

Результати та їх обговорення:

Динаміка змін вмісту *транскрипційного фактору* рNF-кВ у сполучнотканинному регенераті шурів контрольної групи та за експериментального ЦД (Рис.1, А) була схожою. У обох групах мінімальний рівень спостерігався на 7 добу. Головною відмінністю було достовірне зменшення експресії рNF-кВ (р<0,001) в усі терміни спостереження

Динаміка змін вмісту *інгібіторної субодиниці* ІкВ- α в сполучнотканинному регенераті у шурів контрольної групи та за умов гіперглікемії (Рис.1, Б) також мала схожу тенденцію, але й певні відмінності. В перші дні спостереження і на 3 добу ІкВ- α практично не виявлялася як в контрольній групі, так і у шурів з гіперглікемією, або визначалася у фонових концентраціях із незначним переважанням в групі з гіперглікемією. Надалі експресія ІкВ- α в тканині суттєво зростала, визначала пік і поступово знижувалася. В контрольній групі пік зростання визначався на 14 добу, а у шурів із гіперглікемією максимальна концентрація ІкВ- α визначалася на 7 добу. При порівнянні середніх показників між групами в усі терміни спостереження відмінності достовірні (р<0,001).

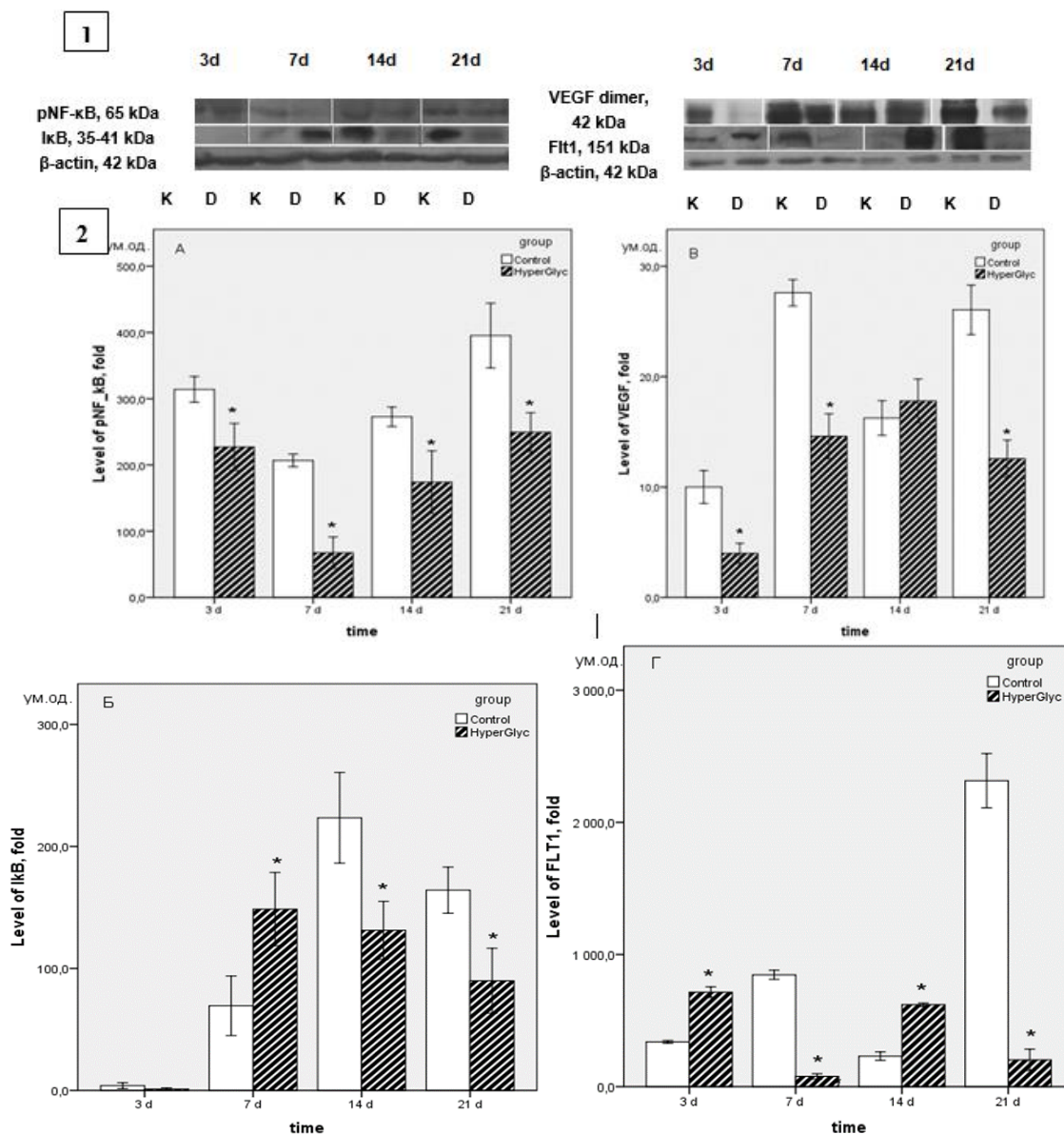


Рис. 1 Вміст протеїнів pNF-κB (А), IκB-α (Б), VEGF (В), FLT1 (Г) в регенераті сполучної тканини шкіри щурів в динаміці загоєння опікової рани (3,7,14,21 доба) в контрольній групі без соматичної патології (світлі стовпчики), за умов стійкої неконтрольованої гіперглікемії (темні стовпчики). 1 - Імуноблота, 2 - гістограма вмісту білка в умовних одиницях * Різниця порівняно з контролем достовірна (P < 0,001)

При дослідженні у сполучнотканинному регенераті шкіри щурів вмісту фактору росту ендотелію судин VEGF (Рис.1,В) в динаміці загоєння рани виявили, що в контрольній групі спостерігається чітка хвильова динаміка його експресії, а у групі щурів із ЦД зміна показника має інший вид. Так, в контрольній групі максимальне значення вмісту VEGF спостерігається на 7 добу та на 21 добу. В групі з експериментальним ЦД вміст VEGF в сполучнотканинному регенераті підвищується з 3ї доби до 14ї доби і на 21шу добу знижується. При порівнянні середніх показників VEGF між групами виявлені достовірні відмінності на 3, 7 та 21 добу (p<0,001).

Дослідження вмісту рецептору VEGFR-1 (Flt-1) в сполучнотканинному регенераті (Рис.1,Г) під час загоєння рани виявило хвильову динаміку змін, але коливання вмісту рецептора в групі контролю та у щурів із гіперглікемією було протилежним. Так, в контрольній групі на 7 добу вміст Flt-1 підвищувався відносно 3ї доби у 2,5 рази (p<0,05), на 14 добу знижувався (p<0,05), а на 21 добу драматично зростав, майже у 10 разів (p<0,05). В групі з гіперглікемією максимальні значення визначалися на 3 та 14 добу (між собою не відрізнялися достовірно). На 7 добу і на 21 добу спостерігалось зниження вмісту Flt-1. Між групами середні значення достовірно (p<0,001) розрізнялися в усі терміни спостереження.

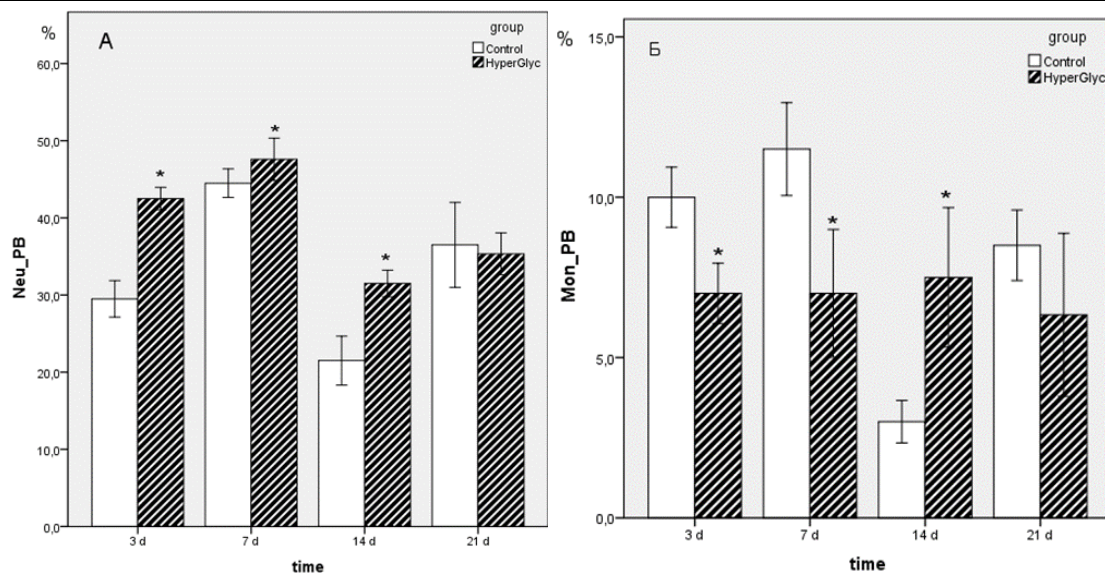


Рис. 2. Відносна кількість (%) клітин периферичної крові нейтрофілів (А), моноцитів (Б) в динаміці загоєння опікової рани (3,7,14,21 доба) в контрольній групі без соматичної патології (світлі стовпчики), за умов стійкої некоригованої гіперглікемії (темні стовпчики). Гістограма відносна кількість клітин (%) * різниця порівняно з контролем вірогідна ($P < 0,001$).

Аналіз клітин периферичної крові (ПК) в обох групах щурів відобразив наявність лейкоцитозу в усі терміни спостереження і найбільш виражені коливання відносного вмісту нейтрофілів та моноцитів (Рис.2). Особливістю спостереження загоєння рани в динаміці стало переважання в периферичній крові щурів із гіперглікемією кількості нейтрофільних гранулоцитів практично у всі строки спостереження (Рис.2,А). Динаміка змін в групах було схожою, але більш вираженою в контрольній групі.

Відносна кількість моноцитів ПК (Рис.2,Б) в контрольній групі також мала хвильову динаміку. Максимальне зростання їх кількості спостерігали на 7 добу, на 14 добу, виявляли значне зниження ($p < 0,05$) із подальшим зростанням ($p < 0,05$) на 21 добу. У групі із гіперглікемією картина була інша. В усі терміни спостереження відносна кількість моноцитів ПК мала незначні зміни, із незначним недостатнім зменшенням на 21 добу.

Було проведено кореляційний аналіз показників для виявлення можливих зв'язків і вивчення взаємопов'язаних процесів та можливих механізмів їх регуляції (Рис.3). Дані щодо мієлограми щурів ми навели в попередній роботі [5].

Між показниками динаміки продукції в сполучнотканинному регенераті шкіри транскрипційного фактору рNF-κB із концентрацією ІκB-α в ході загоєння рани у щурів контрольної групи кореляційного зв'язку не виявлено. В групі з ЦД між продукцією рNF-κB та ІκB-α виявлений зворотній кореляційний зв'язок ($R = -0,6$, $p < 0,01$). Виявлено прямий лінійний кореляційний зв'язок, $R > 0$ ($R = 0,683$, відмінний від 0 на рівні значимості $p < 0,01$) продукції рNF-κB у сполучнотканинному регенераті шкіри контрольної групи із відносним вмістом нейтрофілів КМ. В групі з ЦД між цими

показниками кореляційний зв'язок був ще вище $R > 0$ ($R = 0,738$, $p < 0,01$).

Між продукцією рNF-κB та відносним вмістом моноцитів КМ у щурів контрольної групи не виявлено кореляційного зв'язку ($R = 0$, $p > 0,05$), в групі з гіперглікемією виявлено зворотній кореляційний зв'язок ($R = -0,533$, $p < 0,01$). В КМ між відносним вмістом нейтрофілів та моноцитів у щурів контрольної групи не виявлено кореляції $R = 0$, а за умов гіперглікемії виявлений негативний кореляційний зв'язок ($R = -0,755$, $p < 0,01$). Між відносним вмістом нейтрофілів КМ та нейтрофілів ПК у щурів контрольної групи не виявлено кореляції $R = 0$, а за умов гіперглікемії виявлений негативний кореляційний зв'язок ($R = -0,752$, $p < 0,01$). В ПК при порівнянні в динаміці відносного вмісту нейтрофілів і моноцитів у щурів контрольної групи виявлено лінійний кореляційний зв'язок, $R > 0$ ($R = 0,805$, $p < 0,01$). В групі з експериментальним ЦД між цими показниками кореляційний зв'язок був відсутній. При порівняльному аналізі вмісту в сполучнотканинному регенераті фактору росту VEGF, який є лігандом рецептору Flt-1 із вмістом рецептора в контрольній групі виявлено лінійний кореляційний зв'язок, $R > 0$ ($R = 0,8665$, $p < 0,01$). В групі ЦД між цими показниками кореляційний зв'язок був відсутній. Вміст VEGF в сполучнотканинному регенераті порівнювався із відносною кількістю клітин ПК. У щурів контрольної групи виявлено лінійний кореляційний зв'язок між відносним вмістом нейтрофілів та рівнем VEGF, $R > 0$ ($R = 0,708$, $p < 0,01$). В групі ЦД між цими показниками кореляційний зв'язок був відсутній. Виявлено лінійний кореляційний зв'язок у щурів контрольної групи між відносним вмістом нейтрофілів ПК та рівнем експресії рецептору Flt-1, $R > 0$ ($R = 0,472$, $p < 0,05$). В групі з гіперглікемією

між цими показниками кореляційний зв'язок був відсутній.

Процес ангиогенезу, вкрай необхідний для нормального росту ембріональних тканин і загоєння ран включає в себе взаємодію між про- і антиангіогенних факторів, факторів росту, цитокінів, клітин та позаклітинного матриксу. У фізіологічних умовах процес створення нових кровоносних судин строго контролюється балансом між стимуляторами ангиогенезу і його інгібіторами, при цьому інгібітори превалюють, що перешкоджає надлишковому судиноутворенню [9]. Гіпоксія є основним стимулом ангиогенезу як в фізіологічних, так і в патологічних умовах. При ЦД на тлі гіперглікемії виникають наступні

патологічні події: хронічне запалення, гіпоксія, окислювальний стрес, створення кінцевих продуктів глікірування (AGEs). Внаслідок посиленого накопичення AGEs, які формуються за рахунок неферментативного глікірування білків, ліпідів і нуклеїнових кислот спостерігається виражене порушення структури міжклітинного матриксу і базальної мембрани. Накопичення AGEs викликає зміни в цитоплазмі і ядерних структурах, а також в компонентах позаклітинного матриксу. AGEs, зв'язується з їх специфічними рецепторами - RAGE, здатними активувати оксидази NADPH і підвищити продукцію вільних радикалів кисню[10].

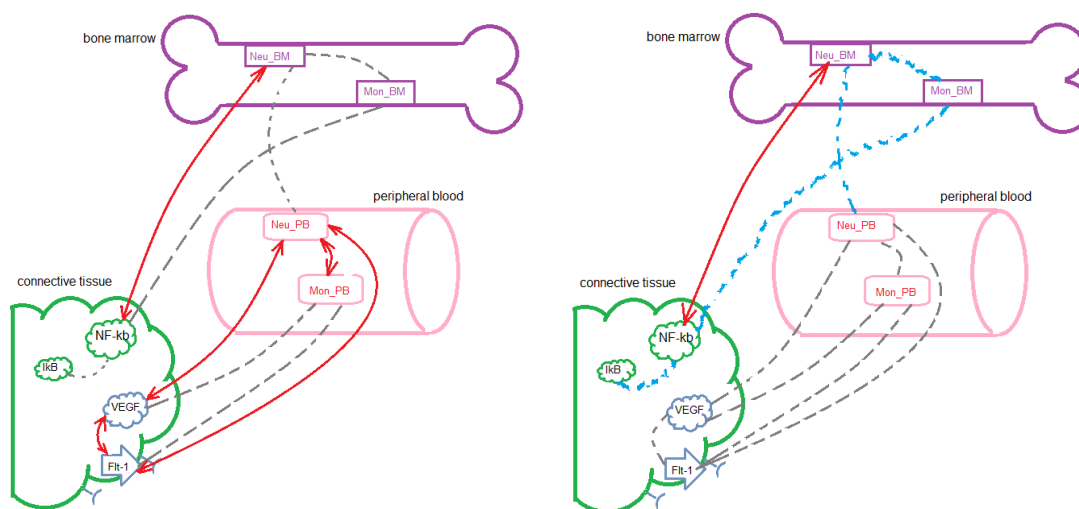


Рис 3. Схема взаємозв'язків різних рівнів регуляції (сполучна тканина, кістковий мозок, периферична кров) через молекулярні маркери-цитокіни та клітинні пули в динаміці загоєння опікової рани в контрольній групі без соматичної патології (А), за умов стійкої неконтрольованої гіперглікемії (В).

Протеїни pNF-κB, IκB-α, VEGF, FLT1 в регенераті сполучної тканини шкіри щурів, Neu_BM – нейтрофіли кісткового мозку, Mon_BM – моноцити кісткового мозку, Neu_PB – нейтрофіли периферичної крові, Mon_PB – моноцити периферичної крові.

Суцільна червона лінія – високий прямий кореляційний зв'язок між показниками, сіра пунктирна лінія – відсутність зв'язку між показниками, блакитна переривчаста лінія – негативний кореляційний зв'язок між показниками.

В наших попередні дослідженнях були вивчені патоморфологічні, гістохімічні та електронномікроскопічні особливості перебігу регенераторного процесу за гіперглікемії і показано достовірне зменшення міграції в рану нейтрофільних гранулоцитів і макрофагів на 3-14 добу та структура грануляційної тканини на 21 добу експерименту, яка містить у порівнянні з контролем менше фіброblastів, більше макрофагів і нейтрофільних гранулоцитів. [3]. Також показано, що в клітинах грануляційної тканини щурів з опіковою травмою на тлі гіперглікемії змінюється енергетичний обмін в бік зниження процесів тканинного дихання та термінального окиснення за одночасного підсилення рівня

активності ензимів гліколізу, що свідчить про розвиток в шкірі тканинної гіпоксії. У динаміці перебігу зміна активності ЛДГ і НАДН-ДГ в макрофагах та фіброblастах мала тенденцію до посилення на 7 та 14 добу експерименту і достовірно відрізнялась у ході спостереження від показників на 3 добу ($p < 0,05$)[11].

Електронномікроскопічний аналіз показав[4], що в нормі на 7 добу після нанесення опікової травми у дермі шкіри макрофаги виявляються з багаточисельними відростками, що призводить до збільшення адгезивних контактів. Через 14 діб після нанесення опікової травми відзначається досить велика кількість колагенових волокон та відновлення диференційовки деяких фіброblastів у фіброцити. Кровоносні капіляри набрякли, а просвіти їх obtуровані набряклими ендотеліоцитами. У щурів з гіперглікемією на 7 добу виявлене зменшення кількості фіброblastів та суттєву перебудову їх структурної організації, що негативно відзначається на комунікативних зв'язках фіброblastів з іншими клітинами. Макрофаги також втрачають частину своїх відростків і в цих клітинах зменшується кількість первинних та вторинних лізосом. У кровоносних судинах різного калібру розширена середня оболонка за рахунок накопичення значної

кількості аморфної речовини, представленої глікозаміногліканами (ГАГ), які буквально замурують гладком'язові клітини та їх відростки. Таким чином, гіперглікемія зумовлює відтермінування у часі регенераторних процесів у дермі і епідермісі шкіри, виявлені ознаки затримки ангиогенезу і порушення трофіки підлеглих тканин дерми за рахунок потовщення середньої оболонки у судинах артеріального типу, що свідчить про зміну архітекtonіки ткани.

Вивчення вмісту внутрішньоклітинних протеїнів за умов стійкої гіперглікемії надає підставу вважати, що реактивність сполучної тканини і механізмів регенерації пригнічена у тварин з гіперглікемією. Регуляторний шлях транскрипційного фактору NF- κ B та гальмівної субоднини I κ B- α є спорідненим. Але суттєвою відмінністю від контрольної групи є достовірно менша початкова концентрація pNF- κ B та I κ B- α в регенераті опікової рани і наявність зворотної кореляції між показниками. В той же час багатьма авторами описано підвищення вмісту фактору NF- κ B за умов гіперглікемії як в експериментах *in vitro*, наприклад, в культурі гладких міоцитів судин за умов підвищення рівня глюкози до 25 ммоль/л, так і *in vivo* [12] у нейронах мишей із експериментальним стрептозотоциновим ЦД. Ми вважаємо, що динаміку pNF- κ B в регенераті при загоєнні визначає саме послідовність реакцій загоєння сполучної тканини, як відображення регуляторних механізмів, активованих пошкодженням, запаленням, а течією регенерації.

Зворотній зв'язок між pNF- κ B та I κ B- α , який здається логічним, а він не виявлений в нормі і виникає лише за умов гіперглікемії, що надає підставу вважати таку взаємодію регуляторних протеїнів патологічною. Вірогідно, за нормальних умов гальмування активності транскрипційного фактору pNF- κ B повинно бути відтермінований, у порівнянні із його експресією.

Висока кореляція пулу гранулоцитів КМ із pNF- κ B показує, що функціональні зміни в КМ відбуваються за наявності гуморального сигналу у вигляді G-CSF, підвищення сироваткової концентрації якого наведено в роботі [13]. Ми можемо припустити, що тригером цього сигналу з вогнища є транскрипційна активність pNF- κ B, яка призводить до експресії факторів росту для КМ. За умов гіперглікемії ми виявили підвищення кореляції транскрипційного фактору та проліферацію нейтрофілів КМ, але із загальною кількістю була менше, ніж в нормі, як і експресія pNF- κ B, вважаємо, це також доказом впливу pNF- κ B, на проліферативну активність КМ, яка зберігається при ЦД. В наших попередніх роботах наведено, що за умов ЦД в КМ переважає проліферація гранулоцитарних попередників, а диференцировка клітин значно погіршується, і тому суттєво зменшується кількість функціонально спроможних нейтрофілів гранулоцитів - клітин, які мають найважливіше значення у процесі загоєння рани. [14]

Наявність зворотного зв'язку між відносним вмістом нейтрофілів КМ та нейтрофілів ПК, підвищення нейтрофілів в ПК на тлі достовірного зменшення вмісту нейтрофілів і моноцитів в тканини на ранніх строках спостереження [3] доказує зменшення клітинної міграції на тлі ЦД. Цей факт повністю співпадає з дослідниками, які показали, що при цукровому діабеті через патологічні зміни КМ виникає порушення виходу клітин у периферичний кровоток [15], і ситуація не поліпшується навіть за умов подразнення у вигляді фізіологічного сигналу.

Виявлений зворотній зв'язок між експресією pNF- κ B та моноцитами КМ та між моноцитами КМ і нейтрофілами КМ, поряд з даними про порушення процесів мобілізації клітин з КМ при ЦД демонструє суттєву зміну ступеню участі цих клітин в процесах росту і репарації судин за умов ЦД.

В даний час існує безліч експериментальних даних, які доводять здатність нейтрофілів синтезувати і секретувати широкий спектр цитокінів у відповідь на різноманітні запальні стимули і вносити вклад в секрецію цитокінів при деяких патологічних станах. Нейтрофіли залучають NF- κ B до регуляції власного апоптозу, реакцій на мікробні модуліни, хемоаттрактанти, цитокіни та інші фактори. Серед цитокінів, що продукують нейтрофіли, важливе місце займають представники сімейства інтерлейкіну (IL) -1, що є головним медіатором розвитку місцевої запальної реакції, де грає ключову роль в регуляції нейтрофільного рекрутування у вогнище запалення [16]. При ЦД в кілька разів зростає базальна секреція IL-1 β (разом з IL-1Ra, IL-8 і TNF α). Вивільнення IL-1 β збільшується ще більше при стимуляції нейтрофілів ліпополісахаридами (LPS), що забезпечує продукцію IL-8 нейтрофілами через аутокринно/паракринні механізми. Цікаво, що моноцити за цих умов демонструють тільки тенденцію до збільшення цитокінової продукції, що свідчить про більшу чутливості нейтрофілів до патологічних умов [17].

За нашими спостереженнями, що за умов гіперглікемії загальна кількість нейтрофілів в ПК у всі строки загоєння була вищою, ніж у контролі. Враховуючи, що лейкоцитоз ПК виникає переважно за рахунок нейтрофілів, ці дані співпадають зі спостереженнями авторів [18] на мишах з діабетом, які продемонстрували лейкоцитоз. Підвищення кількості нейтрофілів в ПК може бути поглибленою реакцією на прозапальні цитокіни на тлі системного запалення при ЦД. В той же час ці нейтрофіли не є функціонально спроможними (за рахунок зменшеної диференцировки в КМ) [5]. В нормі вміст ендотеліального фактору VEGF в регенераті сполучної тканини під час загоєння рани відображає хвильову динаміку змін, яка знаходиться у кореляції із рецептором Flt1 і кореляції із вмістом нейтрофілів ПК. Це надає підставу вважати, що ангиогенез, який активується при фізіологічній репарації сполучної тканини,

забезпечується саме нейтрофілами крові, які надходять у вогнище шляхом хемотаксису протягом усього часу відновлення тканини, що у значній мірі підтверджується іншими дослідниками [19]. За умов ЦД зменшення трансміграції нейтрофілів в регенерат, зменшення вмісту VEGF та Flt-1, інший сценарій динаміки експресії протеїнів і відсутність кореляційних зв'язків між показниками при ЦД свідчить про погіршення і пролонгацію гоєння ран при гіперглікемії, яка обумовлена зміною міжклітинної взаємодії в сполучнотканинному регенераті.

Одже, за умов експериментального ЦД зберігається направленість еволюційно «глибоких» регуляторних механізмів при ініціації відповіді організму на ураження тканини у вигляді експресії внутрішньоклітинного регулятора транскрипції генів в регенераті та його впливу на проліферативну активність КМ, але ступень цієї відповіді є меншою ніж в нормі. Найбільші зміни виявлені в периферичній ланці відповіді. На тлі гіперглікемії зменшується клітинна міграція з КМ в ПК та з ПК в сполучнотканинний регенерат. Відносна кількість нейтрофілів в ПК збільшується, але питомий вміст нейтрофілів в тканині виявляється меншим поряд із зменшеною динамікою вмісту найпотужніші ангиогенних цитокінів VEGF та Flt-1.

Таким чином за ЦД відбувається зміна послідовності реакцій загоєння рани, зміна міжклітинної кооперації та зменшення ефективності паракринного впливу між клітинами у вигляді регуляторних сигналів для стимуляції ангиогенезу. Це запобігає фізіологічному перебігу загоєння опікової рани, призводить до патологічних змін судин, відтермінує та порушує відновлення архітектоники сполучної тканини, і може бути важливим чинником погіршення регенерації тканин при ЦД.

References

1. Parfenova E.V., Tkachuk V.A. Hyperglycemia impact on angiogenic properties of endothelial and progenitor vascular cells// Vestn Ross Akad Med Nauk.- 2012.-V.1.-p.38-44.
2. Vempati P., Popel A.S. Gabhann F. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning//Cytokine & Growth Factor Reviews. -2014.-V.25(1).-p.1-19
3. Kolesova N., Natrus L., Litvinenko V., et al. Dynamic of connective-tissue cell reactions of the skin of white rats with burn injury and persistent uncorrected hyperglycemia. *Medichna nauka Ukraїni.* 2016; 12(3-4), 4-11(in Ukrainian)
4. Stechenko L.A., Natrus L.V., Ryzhko I.M. Ultrastructural basis of interaction of rat connective tissue cell tubes under conditions of burn injury and hyperglycemia //Світ медицини та біології. -2017.-V.4(62) .-p.157-161
5. Ryzhko IM, Natrus LV Dynamic changes in the cellular composition of the bone marrow of rats in

normal wound healing and hyperglycemia// *Medichna nauka Ukraїni.* 2018; 14(3-4), 25-29(in Ukrainian)

6. Oeckinghaus A., Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009; 1(4)

7. Gong Y., Koh D.R. Neutrophils promote inflammatory angiogenesis via release of preformed VEGF in an in vivo corneal model. *Cell Tissue Res.* 2010; 339:437-448

8. Grunewald M., Avraham I., Dor Y., Bachar-Lustig E., Itin A., Jung S., Chimenti S. Landsman L., Abramovitch R., Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell.* 2006. 13; 124(1):175-89.

9. Rask-Madsen C., King G.L. Vascular Complications of Diabetes: Mechanisms of Injury and Protective Factors// *Cell Metabolism.*-2013.-V. 17, IS. 1, p.20-33

10. Yan S.F, Ramasamy R., Schmidt A.M. The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature.//*Circ Res.*-2010.-V.106.-p.842-853.

11. Natrus LV, Verko NP, Ryzhko IM, Panova TI., The dynamic of the energy metabolism of the cells of white rats skin connective tissue under conditions of the burn injury and hyperglycemia// *Medichna nauka Ukraїni.* 2018; 14(1-2), 3-10(in Ukrainian)

12. Song Y., Zhang F., Ying C., Kumar K.A., Zhou X. Inhibition of NF-κB activity by aminoguanidine alleviates neuroinflammation induced by hyperglycemia. *Metab Brain Dis.* 2017;32(5):1627-1637.

13. Rutella S., Zavala F., Danese S., Kared H., Leone G. Granulocyte Colony-Stimulating Factor: A Novel Mediator of T Cell Tolerance//*Immunol.* – 2005 – V.175(11)– p. 7085-7091

14. Zak K.P. Role of neutrophilic leukocytes in pathogenesis of diabetes type 1 in human (analytical review)//*International endocrinological journal.*-2016.-V.2(74).-p.130-139

15. Albiero M., Avogaro A., Fadini G.P. Restoring stem cell mobilization to promote vascular repair in diabetes. *Vascul Pharmacol.* 2013; 58(4): 253-8.

16. Mayansky A.N., Mayansk N.A., Zaslavskaya M.I. Nuclear factor-κB and inflammation//*Cytokines and inflammation.*-2007.- V. 2. p. 3

17. Hu Z., Murakami T., Tamura H. and all Neutrophil extracellular traps induce IL-1β production by macrophages in combination with lipopolysaccharide// *Int J Mol Med.*-2017.-V.39(3)-p.549-558.

18. Huang J., Xiao Y., Xu A. Neutrophils in type 1 diabetes// *J Diabetes Investig.* 2016 Sep; 7(5): 652-663.

19. Mahdy R.A., Nada W.M., Hadhoud K.M., El-Tarhony S.A. The role of vascular endothelial growth factor in the progression of diabetic vascular// *Clinical Study.*-2010.- v.24, p.1576-1584